

茶の品質評価のための新規分析法の開発

著者	堀江 秀樹
号	633
発行年	2001
URL	http://hdl.handle.net/10097/17096

氏 名(本籍) ほり 堀 え 江 ひで 秀 き 樹

学 位 の 種 類 博 士 (農 学)

学 位 記 番 号 農 第 6 3 3 号

学位授与年月日 平 成 13 年 7 月 19 日

学位授与の条件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 茶の品質評価のための新規分析法の開発

論文審査委員 (主 査) 教 授 大 類 洋
教 授 宮 澤 陽 夫
教 授 大久保 一 良

論文内容要旨

第1章 序論

茶は、農産物のなかでもその品質により価格差が著しく大きい。従って、その品質を的確に評価することは、公正な売買において重要とされるものの、現在に至るまでその評価は主として味覚や嗅覚・視覚等官能評価に依存するものであった。いっぽうで、半世紀以上にも及ぶ茶品質の科学研究の結果、化学成分と品質や味との関係が明らかにされてきた。すなわち茶の苦渋味には茶タンニンとも呼ばれるカテキン類が寄与し、主要カテキン類としては(-)-epigallocatechin gallate(EGCg)、(-)-epigallocatechin(EGC)、(-)-epicatechin galate(ECg)、(-)-epicatechin(EC)があげられる。また茶のうま味には遊離アミノ酸が寄与すると考えられ、アミノ酸の中でも 50 %以上はテアニン(theanine)と呼ばれる茶特有のアミノ酸で占められている。さらに、上級茶ほどテアニンなどのアミノ酸の含量が高いことも明らかにされている。また、カフェインは苦味を示すとともに、中枢神経興奮作用を示すことから品質上重要な成分である。アスコルビン酸は茶を長期保存すると含量が低下することから、鮮度の指標として重要である。これら品質成分の分析手法も確立されつつあるが、比色分析法や高速液体クロマトグラフィ(HPLC)など従来の化学分析法を用いる限り、必要とされる時間と操作性に問題があり、茶の製造や流通の現場で品質評価に用いることは困難である。そこで、従来の手法をより迅速・簡便化し、分析作業の効率化を図ることを目的にキャピラリー電気泳動法とバイオセンサー法の導入を行い、茶の品質評価のための新規分析法の開発を試みた。

第2章 キャピラリー電気泳動法を利用した茶の品質成分分析法の開発

茶の品質と関連の深い成分として、カテキン類、カフェイン、さらにテアニンを初めとした遊離アミノ酸類、アスコルビン酸があげられる。従来の化学分析ではこれらの成分を個別の方法で分析する必要があったが、このような分析作業には多大の労力と時間を要した。そこで、キャピラリー電気泳動法を導入し、これらの成分を同時分析することにより、分析作業の効率化・迅速化をはかった。

また、茶にシュウ酸等の有機酸が含まれることは知られていたが、その味や健康への影響について、ほとんど議論されてこなかった。そこでシュウ酸などの有機酸とうま味を示すアミノ酸であるアスパラギン酸、グルタミン酸をキャピラリー電気泳動法により同時分析する手法を開発した。

2-1 キャピラリー電気泳動法による茶主要品質成分の分析

茶の品質成分として重要性が認められているテアニン、カフェイン、アスコルビン酸、及びカテキン類について、キャピラリー電気泳動法による定量を試みた。ホウ酸緩衝液を電気泳動液としたキャピラリーゾーン電気泳動法とし、200nm で検出することにより、茶浸出液中の主要カテキン類の分離に成功した。さらにテアニン、アスコルビン酸との同時分析も可能となった。

しかしながら、電荷を持たないカフェインについては、試料中の有機溶媒の影響を受けやすかった。そこで、ミセル動電クロマトグラフィーの要素も組み入れ、電気泳動液にドデシル硫酸ナトリウムを添加することにより、カフェインの分離を改善した。さらに検出波長である 200nm における吸光度が低く、定量が困難であったアスコル

ビン酸については、ダイオードアレイ検出器を用いて第二の検出波長として 270nm を設定することにより、これら多成分の同時定量が可能になった（図 1）。茶の浸出液については希釈するだけで分析が可能であった。茶葉中に存在する各成分の含有量を測定する場合には、2%メタリン酸とエタノールの等量混合液を抽出に用い、この抽出液を水で 10 倍以上に希釈すればよいことを明らかにした。このような方法を用いれば、一度の抽出で主要成分が同時分析できるだけでなく、分析に要する時間も 1 試料あたり 20 分程度と従来法と比べて短いため、時間と労力は大幅に節減できる。

さらに、本手法では抽出液が数十 μ l あれば主要成分の同時分析が可能である。従って、チャの葉や心が 1 枚あれば主要成分の分析値を得ることが可能となり、今後茶の生理研究などへの応用も期待される。

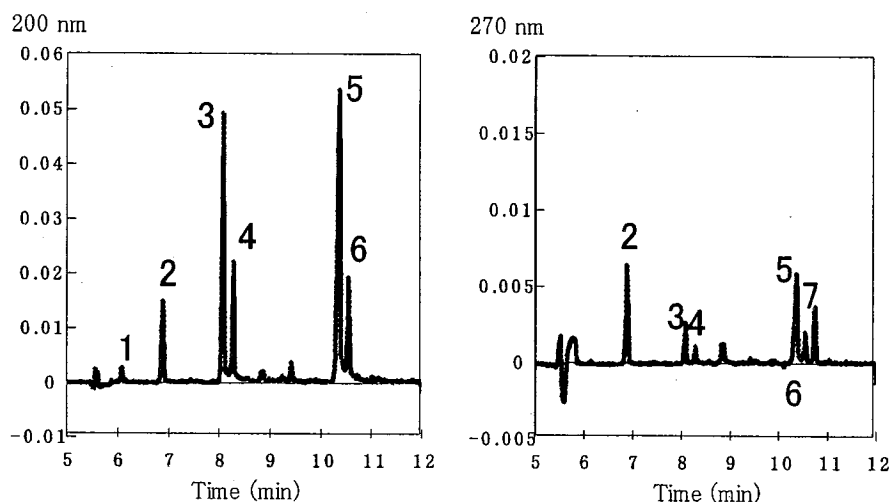


図 1 キャピラリー電気泳動法による主要茶成分の分析

1:テアニン, 2:カフェイン, 3:EGC, 4:EC, 5:EGCg, 6:ECg, 7:アスコルビン酸。

分析条件

電気泳動液: pH8.2, 50mM ホウ酸, 10mM リン酸水素二ナトリウム, 50mM ドデシル硫酸ナトリウム, 10%メタノール。

キャピラリー管: 内径 0.075mm * 全長 570mm. 印加電圧: 25kV.

キャピラリー管温度: 20℃. 注入: 5 秒間高圧注入. 検出波長: 200nm 及び 270nm.

試料調製

250mg の粉末化した煎茶葉を 25ml 容メスフラスコに秤量し、これに抽出液（2%メタリン酸：エタノール（体積比 1:1））を加えて室温で 30 分間振とう抽出した。上澄みを水で 10 倍希釈し、メンブレンフィルターを通したものを試料とした。

2-2 茶中の有機酸の分析とそれらの品質への寄与

茶の主要有機酸であるシュウ酸、リンゴ酸、クエン酸、キナ酸と茶のうま味に関係すると考えられている酸性アミノ酸であるグルタミン酸、アスパラギン酸を同時に 10 分間で分析するキャピラリーゾーン電気泳動法を開発した（図 2）。これは、クロム酸塩を泳動液としてインダイレクト法で検出している。茶葉に含まれる金属イオンの影響は、電気泳動液と試料液の双方にエチレンジアミン四酢酸ナトリウムを添加することにより除去した。分析に要する時間もキャピラリー管の洗浄を含めても 10 分程

度であり、他の分析手法に比べて短かった。

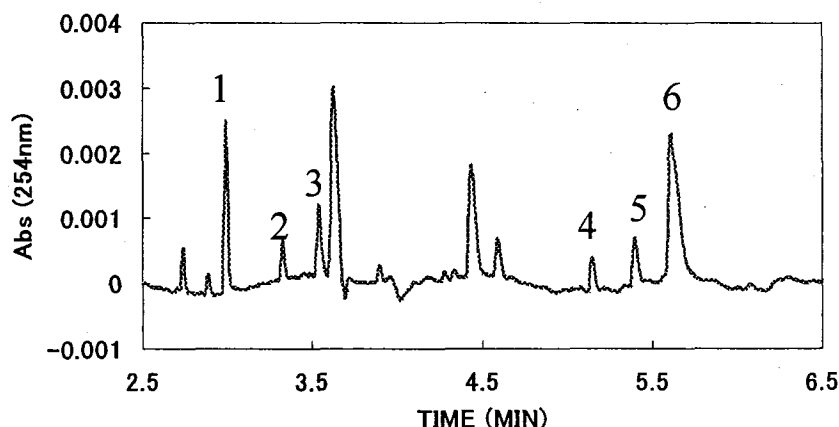


図2 キャピラリー電気泳動法による煎茶浸出液中の有機酸及び酸性アミノ酸の分析

1:シュウ酸, 2:クエン酸, 3:リンゴ酸, 4:アスパラギン酸, 5:グルタミン酸, 6:キナ酸.

分析条件

電気泳動液: 10mM クロム酸ナトリウム, 0.1mM エチレンジアミン四酢酸ナトリウム, 0.5mM テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド.

キャピラリー管: 内径 0.075mm * 全長 570mm. 印加電圧: -20kV.

キャピラリー管温度: 20 °C. 注入: 5 秒間高圧注入. 検出波長: 254nm.

試料調製

3 g の煎茶葉を 180ml の沸騰水で 3 分間抽出し、濾液に終濃度 0.25mM になるようエチレンジアミン四酢酸ナトリウムを加えて 5 倍希釈, メンブレンフィルターを通したものを試料とした.

この方法を用いることにより、シュウ酸が茶のあと味に影響すること、またクエン酸にシュウ酸の味を抑制する作用のあること、硬水で入れた茶が濁るのは茶中のシュウ酸が関与することなどを明らかにし、有機酸類の品質成分としての重要性を初めて示した。さらに、グルタミン酸／アスパラギン酸比は通常の茶では一定の範囲に収まるので、グルタミン酸ナトリウム等で味付けされた茶の判別にも、本法は応用できる。

第3章 酵素反応を利用した茶品質成分の簡易迅速分析法の開発

第2章ではキャピラリー電気泳動法の利用について述べたが、大規模な工場や分析施設には導入可能であったとしても、一般の茶工場や農協にまで導入することは、現状では経済的にもまた操作性の面からも困難である。そこで、多成分を同時に分析することはできなくとも、より簡易で扱いやすい装置の開発が望まれる。バイオセンサーは、小型・軽量化することが可能で、特殊な試薬を必要としない点で現場での分析に最適である。そこで、本章では、主要な茶成分の分析にバイオセンサー法を導入した。なお、現場での分析を指向するため、いずれの場合も、試料調製については抽出と濾過の操作以外はほとんど必要としないシステムとした。

3-1 バイオセンサー法による茶浸出液中カテキン類の迅速分析

カテキン類は苦渋味に関与し茶の重要な品質成分である。カテキン類を簡易に分析

するには、ポリフェノールオキシダーゼの利用が考えられる。ポリフェノールオキシダーゼは多くの植物組織に認められるので、入手容易な野菜・果実類のなかからゴボウを選択し、ゴボウ組織と酸素電極を組み合わせたセンサーを調製した(図3)。ゴボウ組織中のポリフェノールオキシダーゼが、カテキン類を酸化する際に酸素が消費されるので、酸素電極により酸素濃度を測定することにより、カテキン類濃度を測定するものである。操作は、酢酸緩衝液を流して酸素濃度を示す電流値が一定になった後に、酢酸緩衝液の代わりに、茶浸出液を緩衝液で希釈した試料液を流すだけである。本センサーは、精製されたポリフェノールオキシダーゼを用いた酵素センサーに比べて、格段に安定性に優れ、カテキン類センサーとして利用できる最初のものである。

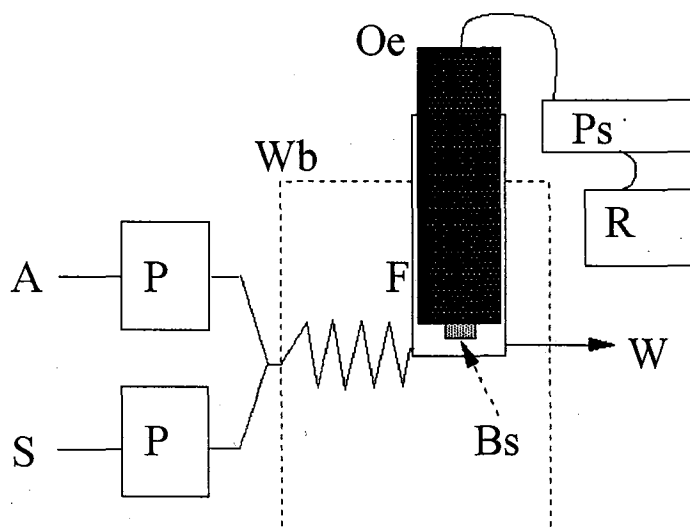


図3 ゴボウ組織を用いたカテキン類センサー

A: 空気 (流速 2ml/min), S: 酢酸緩衝液 (pH6.0, 0.1M) または緩衝液で希釈した茶浸出液試料 (流速 2ml/min), P: ペリスタポンプ, F: フローセル, Oe: 酸素電極, Bs: 厚さ 0.2mm 程度にスライスしたゴボウ組織, Ps: ポテンシostat (印加電圧 -0.7V), R: レコーダー, W: 廃液, Wb: 恒温水槽 (25℃).

* S から緩衝液を送液し電流値が安定した後、S を茶浸出液試料を緩衝液で希釈した液に交換し、ゴボウ組織中のポリフェノールオキシダーゼによるカテキン類の酸化に伴う酸素濃度の低下を酸素電極で検出する。

一方、カテキン類の中でも渋味の強いのは、EGCg に代表するエステル型カテキン類と呼ばれる成分である。エステル型カテキン類から、酵素タンナーゼの作用により、没食子酸が遊離する。そこでタンナーゼを固定化したガラスビーズを詰めたカラムと pH-ISFET (イオン感応性電界効果型トランジスタ) 電極を組み合わせたフローインジェクション分析システムを開発した(図4)。エステル型カテキン類から没食子酸が遊離する際の pH の低下を、pH-ISFET 電極で測定するものである。本法での試料あたりの分析時間は3分で、HPLC を用いた分析に対して10分の1以下に時間が短縮された。各種茶浸出液について本システムで得られた結果と高速液体クロマトグラフィーを用いたエステル型カテキン類分析値の間には高い相関がみられた。本システムに

おいては、茶自身に由来する pH 変化の影響を受けないよう、pH 補正を行うための ISFET-pH 電極を組み入れたのが特徴である。

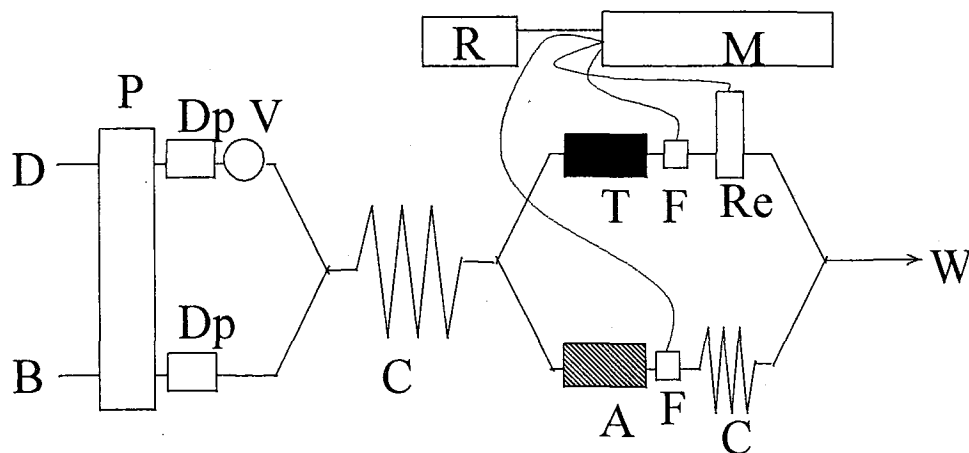


図4 エステル型カテキン類分析用フローインジェクションシステム

D:蒸留水, B:緩衝液 (10mM フタル酸緩衝液, pH5.5), P:ペリスタポンプ (流速各 0.35ml/min), Dp:ダンパー; V:インジェクションバルブ (サンプルループ 0.1ml), C:コイル, T:タンナーゼ固定化ガラスビーズを詰めたカラム (内径 1mm * 20mm), A:アルブミンを固定化したダミーカラム (サイズは T と同じ), F: pH-ISFET 電極, Re:比較電極, M:pH メーター本体, R:レコーダー, W:廃液.

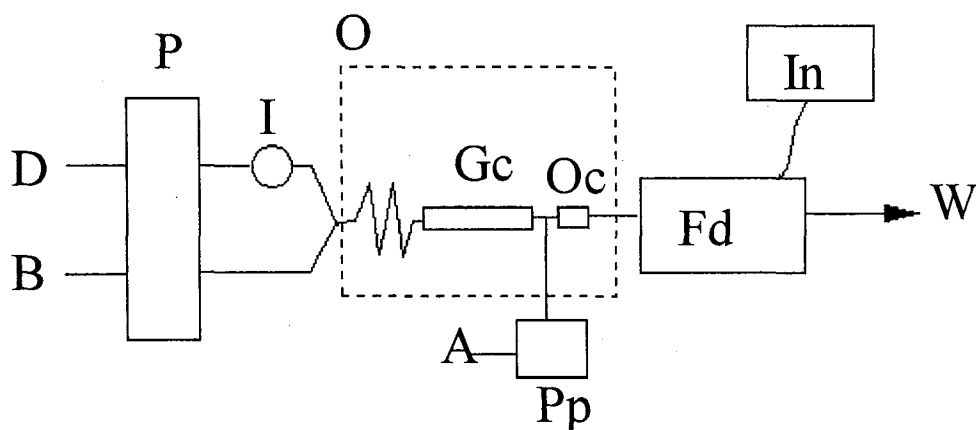
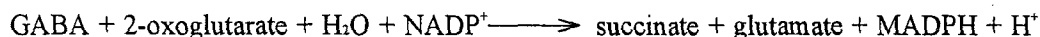


図5 γ -アミノ酪酸測定用フローインジェクションシステム

D:蒸留水, B:緩衝液 (pH8.0, 100mM トリス緩衝液, 400mM 硫酸ナトリウム, 1mM NADPH⁺, 5mM 2-オキシグルタル酸, 2mM メルカプトエタノール), P:ポンプ (流速 0.2ml/min), I:インジェクションバルブ (サンプルループ 0.02ml), Gc:GABAse 固定化ガラスビーズを詰めたリアクター (内径 1mm * 100mm), Oc:HPLC 用 C18 充填剤を詰めたカラム (内径 4.6mm * 10mm), A:酢酸 (1%), Pp:ペリスタポンプ (流速 0.2ml/min), Fd:蛍光検出器 (励起波長 360nm, 検出波長 460nm), In:インテグレータ, O:HPLC 用カラムオーブン (30 °C), W:廃液.

3-2 バイオセンサー法による茶浸出液中遊離アミノ酸の迅速分析

γ -アミノ酪酸 (GABA) 含量を高めた茶に血圧上昇を抑制する作用が認められ、すでにギャバロン茶として市販されている。有効成分である GABA をアミノ酸分析法により評価するには、高価格な装置と分析時間を必要とするため、GABA を簡便に測定する手法の開発が求められる。そこで、酵素 GABAse を固定化したカラムを用いて、NADPH の生成に伴う蛍光を検出するフローインジェクション法を開発した (図 5)。本法における酵素反応は次式に従い、ギャバロン茶抽出液中の GABA 濃度を 4 分で分析できた。



本法は、GABA を測定対象とした最初のセンサーであり、また茶自身に由来する蛍光を分離するため、フローインジェクションの流路に HPLC 用の C18 充填剤を詰めたミニカラムを接続するなどの新しい試みがなされている。

テアニンなどの遊離アミノ酸は茶のうま味に関与し、最も重要な品質成分である。そこで、遊離アミノ酸の簡易分析のため、L-アミノ酸オキシダーゼ固定化膜と酸素電極を組み合わせたアミノ酸センサを作製した。原理は、L-アミノ酸オキシダーゼによって茶試料中のアミノ酸が酸化されることにともなう酸素の減少を酸素電極で測定するものである。このセンサーはテアニンやアルギニンなど高品質の茶に多く含まれるアミノ酸に応答する傾向があり、本センサーの分析値は茶の品質や価格を反映した。

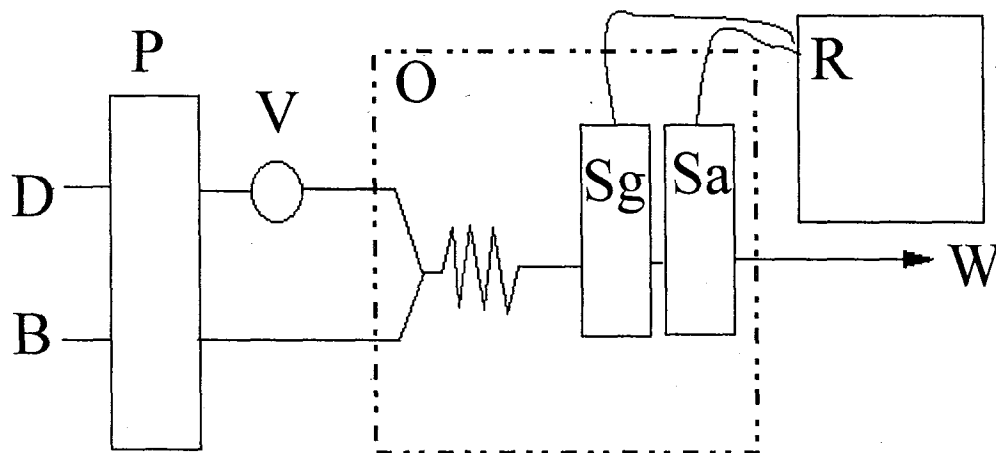


図6 全アミノ酸、グルタミン酸同時分析用フローインジェクションシステム

D:蒸留水 (流速 0.7ml/min), B:緩衝液 (pH6.4, 1/15M リン酸緩衝液, 流速 2.7ml/min), P:ペリスタポンプ, V:インジェクションバルブ (サンプルループ 0.1ml), Sg:グルタミン酸センサー (酸素電極とグルタミン酸オキシダーゼ固定化膜よりなる.), Sa:アミノ酸センサー (酸素電極と L-アミノ酸オキシダーゼ固定化膜よりなる.), O:HPLC 用カラムオープン (30 °C), R:レコーダー, W:廃液.

さらに測定の迅速化と高感度化をめざし、フローインジェクション法化した。本センサーを、同様の原理で作成したグルタミン酸センサーと組み合わせることにより、茶浸出液をそのまま注入し、2 分以内にアミノ酸とグルタミン酸が同時に分析できる

システムを開発した（図6）。アミノ酸センサーは高品質な茶において応答が高く、また、本システムでは、うま味の強いアミノ酸であるグルタミン酸の濃度も同時に分析できた。本システムは茶の品質やうま味の迅速な評価に用いることができる。

第4章 総括

茶の品質評価を迅速化するため、ふたつの方向からアプローチした。ひとつはキャピラリー電気泳動法を用いた方法で、1試料あたり10～20分間で、多成分の同時分析が可能である。本法は、分析の迅速化・省力化に寄与し、さらに1枚の葉などのような少量の試料にも対応できる手法である。また、この方法により有機酸の重要性が認識されるなどの研究成果も上がってきている。しかしながら、現在のところまだ分析装置が高価で、取り扱いに多少の化学的知識が必要な点に問題点が残る。従って、この方法の利用は当面、大規模な製茶工場や茶流通業者、分析施設などにとどまるであろう。もうひとつの方法は、バイオセンサー法を利用したもので、1～2成分について数分～10分以内という迅速な分析が可能であった。しかもこれらの方法では、操作が簡便なため、より現場に適用しやすい手法といえる。ただ普及するには、装置の小型化と酵素膜あるいは酵素カラムなどの安定で廉価な供給が必須である。

ここで開発した手法が研究現場から流通の現場において、特徴を活かして適切に利用され、高品質な茶の生産や適正な流通に役立てられることを願ってやまない。

論文審査結果要旨

茶の品質評価は現在専門家の味覚・嗅覚・視覚等の官能に依存しており、数値として表せず客観的でないという欠点がある。最近、客観的数値化のために HPLC 法の評価への導入が検討され始めたが分析に時間を要することと、感度に問題があることが新たな問題として浮かび上がった。本研究はこれらの問題点を克服する目的で、キャピラリー電気泳動およびバイオセンサーを導入し、高感度・迅速、且つ再現性に優れた分析法を開発し、茶の新しい品質評価法を確立することを目的として行なわれたものである。それ故、論文審査は従来法および HPLC 法と本研究によって開発された方法との比較に重点を置いて行った。

1. キャピラリー電気泳動法に関する審査：

従来個別に化学分析法で定量されていたカテキン類、カフェイン、遊離アミノ酸、アスコルビン酸、シュウ酸、クエン酸等を短時間に高感度で同時分析する方法を開発した点を高く評価した。更に、本分析法を用いることにより初めて「有機酸類の品質成分としての重要性」を明らかにしたこと、グルタミン酸ナトリウムなどで味付けされた茶と天然茶との判別法を開発したこと、など新しい事実を見出した点をも高く評価した。本分析法は茶葉1枚、茶芯一本で品質の情報を得ることが出来る高感度迅速品質評価法であるが、キャピラリー電気泳動装置は一般の茶工場や農協に導入することは、経済的にもまた操作性の面からも問題があるので、茶の品質評価専用の簡易なキャピラリー電気泳動装置の開発が今後の研究課題であると指摘した。本分析法は茶の品質評価にも適用出来るが、むしろ茶の品質改良研究のために有用であるとの評価を行なった。

2. バイオセンサー法に関する審査：

本研究により開発されたフローインジェクションーバイオセンサー検出分析法はカルボン酸、アミノ酸等の個別定量は出来ないのでキャピラリー電気泳動法に比べると得られる情報は少ないが、カテキン類、 γ -アミノ酪（GABA）、グルタミン酸、テアニン等の総量を簡便かつ選択的に定量する方法であるので茶の品質評価のためには十分であると評価した。更に、キャピラリー電気泳動法で問題となった普及性を本研究で克服した点を高く評価した。本分析法は茶の品質評価そのものに適しており今後の普及が期待されるとの評価を行なった。

以上、本研究は茶の新しい評価法を開発したものであり、初期の目的を十分に達成している。よって、審査員一同は、本論文は博士（農学）の学位を授与するに値すると判定した。